



**Developing a method for a rapid immunoassay kit to detect
Salmonella spp. bacteria**

Ana Sofia Antunes Silvestre

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Doutor Ivo C. Martins
Prof. Doutora Ana Maria Reis



This Dissertation was fully performed at ABDART DIAGNOSTICS LDA (DART Diagnostics), Tec Labs – *Centro de Inovação, Campus da Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa*, Lisbon, Portugal under the supervision of Ivo C. Martins, Ph.D., *Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa* & DART Diagnostics, Lisbon, Portugal, and of Inês Santarino, Ph.D., co-advisor at DART Diagnostics.

Professor Ana Maria Reis was the internal supervisor designated in the scope of the Master in Applied Microbiology of the Faculty of Sciences of the University of Lisbon.

Acknowledgments

This work is much more than a master's dissertation, it reflects all the work of a year that was only achieved due to all the support I had. Many people helped me, each of them in their way and in the best way they could.

I want to thank my supervisor Prof. Doctor Ana Maria Reis, as well as Prof. Doctor Lélia Chambel, who helped me with all their knowledge, sympathy and constant availability for all my questions.

To the entire DART Diagnostics team, who endured me for over a year and welcomed me with open arms, who integrated me without restrictions and taught me more than many books. Thank you, Ana and Patricia for all the advice, for all the liveliest moments and all the support in all areas. Thank you, Ivo for all the knowledge you gave me, for all the microbiological jokes and for welcoming me so well. And thanks Ines for everything, for all the days I was there to torment your life, for all the teachings with mixed laughter, for all the less good times that turned into bacon with fries accompanied with wine.

Thanks also to all the people at Tec Labs who helped me, both scientifically and emotionally, for brightening all my days with your good mood.

I value all my friends who have been able to support me at the right time and say the words I needed to hear. Thank you to those who understood better than anyone all the setbacks and despair and did their best to help me.

Thanking my family and my boyfriend is not enough, but I do not know any word that is enough for you, support me in everything unconditionally and without your presence and your support everything would be more complicated. They are more than my support, they are my strength, my joy and the most important people that I always want with me in everything I do and every achievement I make.

Abstract

Salmonella spp. represents one of the main causes of foodborne diseases worldwide, being thus of extreme importance to ascertain that food items are not contaminated with this bacterium. The oldest and still widely used standard method to test for *Salmonella* contamination of food samples employs classical microbiology bacterial culture techniques. This is a reliable approach but it time-consuming, taking several days for a definitive result. The prolonged delay can sometimes compromise the effective control of this agent, as in the meantime food may have been already sold and consumed (otherwise it can spoil before a result). This in part explains the persistence and severity of *Salmonella* spp. infections: results are obtained *a posteriori* or at least when food is already reaching the consumer. To solve this issue, there have been large sums invested to develop and improve *Salmonella* spp. diagnostic methods, aiming at a more timely control of food contamination.

Given the above, and to contribute to public health safety, DART Diagnostics, a Portuguese start-up, has been developing a method for improving immunoassays. DART employs a confidential technology developed in-house, currently being patented, which improves immunoassays performance by amplifying the signal of a single detection event. This increases the sensitivity, enabling to detect lower quantities of a contaminant. In the case of *Salmonella* spp. in food, this also reduces the need for a pre-incubation (that can take up to 48 hours) to increase bacteria numbers in food samples (in order to reach current detection levels). As lower amounts of bacteria can be detected, at an earlier time, the time to result becomes shorter, avoiding food recalls and shipping contaminated food to the market.

To reach sales, the incorporation of DART technology into an already existing commercial immunoassay *Salmonella* spp. detection kit was evaluated. However, the approach was inappropriate and discontinued, given the relatively high cost and the fact that, as many of the commercial kit components were not disclosed, they possibly originates undesired interactions and/or affect results quality. This could not be easily corrected, as some of the commercial kit components remain unknown. Given these inconveniences, the development of an immunoassay kit from scratch emerged as an option. For that, the dot blot immunoassay was employed, since it was already employed previously, to optimize other conditions in the course of DART technology development. A range of experimental conditions were tested. Samples of *Salmonella* were detected only in specific conditions, possibly due to the DART technology components themselves. Therefore, DART technology was improved. An evaluation of this improved technology was concluded, with encouraging results. Presently, the protocol optimization process should proceed, to find the most appropriate combinations and modifications to achieve the established goal of a more sensitive and rapid method to monitor and control *Salmonella* spp. presence in food items, detecting these bacteria as soon as possible.

Keywords: *Salmonella* spp.; diagnosis; immunoassay; dot blot assay;

Resumo

As doenças transmitidas por alimentos constituem uma grande preocupação de saúde pública, com uma incidência ao nível de milhões de pessoas afetadas, sendo responsáveis por milhares de hospitalizações e mortes anualmente. Estas doenças ocorrem tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Apesar desta realidade e da sua importância, menos de 10% dos casos são relatados. Em países em vias de desenvolvimento a situação ainda é pior, devido aos sistemas de saúde pouco abrangentes e sobrecarregados, estimando-se que menos de 1% dos casos serão devidamente relatados. Isto é especialmente importante porque as referidas doenças têm vindo a crescer e são uma ameaça constante à saúde pública, em todo o mundo, sendo até uma barreira significativa ao desenvolvimento socioeconómico. Mais importante ainda, é o facto que o controlo de qualidade alimentar ser por vezes ineficaz, estando diretamente por trás de casos graves de contaminação de alimentos no mercado. Diversas categorias de contaminantes podem estar envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos, nomeadamente vírus, bactérias, parasitas, produtos químicos e toxinas. Na maioria das regiões do planeta, os microorganismos são os principais responsáveis, especialmente as bactérias. Dentro destas podemos destacar *Salmonella* spp. dada a sua enorme preponderância nos surtos e crises de saúde pública de origem alimentar. Apesar dos esforços contínuos e das medidas estabelecidas para prevenir a salmonelose (infecção por *Salmonella*), a incidência e a gravidade da salmonelose humana continuam a ser um problema persistente e bastante generalizado.

As bactérias do género *Salmonella* spp. são consideradas um dos mais importantes agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Os membros deste género são um perigo persistente de contaminação devido à sua alta capacidade de crescer e de se multiplicar em várias condições ambientais, distribuição generalizada e capacidade de entrar em qualquer uma das várias etapas do processamento de alimentos. Somando a estes problemas, têm ocorrido algumas mudanças comportamentais na sociedade, como a globalização do mercado de alimentos, mudanças nos hábitos alimentares e no sistema de processamento de alimentos em larga escala. Tudo isto pode claramente contribuir para o crescimento do número de casos de infeção por *Salmonella* spp., o que se tem de facto observado. Um grande número de surtos de salmonelose ocorrem em diversos países com bastante frequência, testemunho da dificuldade em monitorizar e controlar a propagação deste agente. Como tal, a deteção rápida, fidedigna e sensível de *Salmonella* spp. em alimentos é essencial para diminuir os efeitos nefastos da sua presença. O método de diagnóstico padrão utilizado baseia-se no uso de técnicas de cultura de microbiologia clássica, uma metodologia simples, com resultados confiáveis, alta sensibilidade e especificidade, alta taxa de sucesso e baixo custo. Contudo, é necessário muito tempo para a obtenção de um resultado, dado que normalmente requer 24 a 48 horas de pré-incubação e enriquecimento para o número de bactérias se tornar detetável pelas técnicas atuais. Por esta razão, na maioria dos casos esta demora não permite testar atempadamente os alimentos antes da sua comercialização e consumo. Na maioria dos casos os alimentos têm de ser vendidos o quanto antes, dado que o seu tempo útil de armazenamento, antes de se deteriorarem, é reduzido. Dado isto, um número substancial de métodos para o diagnóstico de *Salmonella* spp. têm vindo a ser desenvolvidos ou melhorados ao longo dos anos, com especial foco nos métodos moleculares baseados na deteção de ácidos nucleicos, bem como nos métodos baseados em ensaios de imunologia.

Com vista a contribuir para resolver o problema do controle de qualidade alimentar e deteção atempada de contaminantes, a DART Diagnostics, uma start-up Portuguesa, emprega uma tecnologia confidencial desenvolvida internamente, atualmente a ser patenteada, que melhora o desempenho dos imunoensaios, mais especificamente ELISA (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*). O principal objetivo da tecnologia DART é aumentar a sensibilidade dos imunoensaios através da amplificação do sinal de um único evento de deteção, permitindo detetar menores quantidades de *Salmonella* spp. Tendo por objetivo a aplicação desta tecnologia na área alimentar, a deteção de menores

quantidades de bactérias reduz o tempo necessário para obter um resultado e, consequentemente, proporciona um controlo mais rápido dos alimentos, evitando a possível colocação de alimentos contaminados no mercado.

Para o desenvolvimento desta tecnologia, dois serovares distintos de *Salmonella* foram utilizados, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Foram escolhidos estes por serem os principais responsáveis por casos de salmonelose. Outras culturas bacterianas que não *Salmonella*, foram também utilizadas ao longo do estudo como controlos negativos, inclusive *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*. Todas as amostras das várias bactérias foram recolhidas após 6.5 h de crescimento, dado que com este tempo de crescimento demonstraram manter a sua viabilidade após o congelamento sem crioprotetor. De referir que foi evitada a utilização repetida da mesma amostra bacteriana após vários ciclos de congelamento e descongelamento. Tal não é aconselhável, principalmente para a amostra de *Escherichia coli*, dado ocorrer perda de viabilidade. Foi tido o cuidado de avaliar e demonstrar que manter as culturas bacterianas a -80°C durante dois meses não afeta a qualidade das mesmas. Após esse período é recomendada a recolha de novas amostras. Sem esse cuidado, os resultados podem ser afetados.

No desenvolvimento da tecnologia DART, os seus componentes foram aplicados como reagente num kit comercial de *ELISA* para deteção de *Salmonella* spp. Diversas condições e concentrações de vários componentes que integram a tecnologia DART foram testadas no kit comercial, para encontrar a melhor combinação. Foram utilizadas como amostras *Salmonella* Typhimurium e tampão de lavagem (controlo negativo) e em todas as condições testadas o controlo negativo produziu um sinal demasiado elevado. Os diversos componentes da tecnologia foram testados separadamente revelando-se que um destes afetava o sinal de forma inespecífica. Assim, o desenvolvimento da tecnologia DART no kit comercial foi descontinuado, dado o custo por reação e, sobretudo, a ocorrência de ligações inespecíficas acoplada ao facto de que, como muitos dos componentes comerciais do kit não foram divulgados. A resolução destes problemas, na ausência dessas informações, torna-se difícil. Diante desses inconvenientes, sem conhecer os componentes do kit comercial, o desenvolvimento de um kit de imunoensaio de raiz surgiu como uma opção. Para tal, a técnica de *dot blot* foi utilizada, uma vez que já havia sido empregue anteriormente, para otimizar outras condições no decorrer do desenvolvimento da tecnologia DART. Diversas condições experimentais foram testadas e as amostras de *Salmonella*, foram detetadas só em condições muito específicas. Assim sendo, o princípio do sistema de deteção proposto não se comportou como esperado. Por isso, a tecnologia DART foi aprimorada e a avaliação dessa tecnologia melhorada foi concluída, com resultados encorajadores.

Atualmente, o processo de otimização de protocolo deverá prosseguir com o objetivo de encontrarmos as combinações e modificações mais adequadas que permitam alcançar a meta estabelecida de desenvolver um método de *ELISA* mais sensível e rápido para monitorar e controlar a propagação de *Salmonella* spp. Após a otimização e o desenvolvimento de um kit com a tecnologia DART, o desempenho do método na deteção do género *Salmonella* terá de ser testado utilizando amostras de produtos alimentares e comparado com um método de referência de forma a comprovar a sua qualidade. Se efetivamente se demonstrar ser um método de *ELISA* mais sensível e rápido, o seu bom desempenho poderá contribuir para uma melhor vigilância deste agente patogénico e consequentemente diminuir os seus efeitos adversos na saúde pública.

Palavras-chave: *Salmonella* spp.; diagnóstico; imunoensaio; ensaio *dot blot*;